計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-113107

衛生福利部疾病管制署 106 年委託科技研究計畫

開發檢測 arbovirus 的整合型快速檢測試劑

年 度 研 究 報 告

執行機構： 疾病管制署 研究檢驗中心

計畫主持人：張淑芬

協同主持人: 舒佩芸

研究人員：蘇千玲、楊凱蓉

執行期間：106 年 1 月 1 日至 106 年 12 月 31 日

＊本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意*

目　　錄

頁　碼

封面

一、中文摘要　（3）

英文摘要　（4）

二、本文

（1）前言　（5-9）

（2）材料與方法　（10-19）

（3）結果　（20-23）

（4）討論　（23-25）

（5）結論與建議　（26）

（6）計畫重要研究成果及具體建議　（27）

（7）參考文獻　（28）

三、表次、圖次　（29-37）

（26-33）

共（37)頁

中文摘要

由於國際間交通往來日益頻繁，全球氣候也因溫室效應影響，使得病媒性傳染病在全世界散佈情形急速增加,發生頻率也愈趨頻繁與嚴重。為因應未來傳染病之侵入及流行，我們應建立一套完整的病媒性傳染病防疫體系，包括檢驗設備之硬體設施、病媒監測系統網、快速的檢驗技術與有效的防治策略等，以有效的降低傳染病流行，解決公共衛生上的危機。本計畫的主要目標在應用以酵素免疫分析法及免疫色層分析法（Immunochromatographic test; ICT）為基礎，茲卡、日本腦炎及屈公病等 arbovirus 整合型抗體快速檢測試劑，以期能迅速偵測茲卡、日本腦炎及屈公病的境外引進及流行。利用免疫色層分析法為基礎的快速檢測試劑其最大的優點是不需特殊的儀器，操作簡便，能迅速得到檢測結果。有助於快速檢測出傳染病種類，及早實施防疫工作，對病人實施正確的醫療照顧，對傳染病的防治工作有極大的幫助。

關鍵詞：–茲卡病毒、酵素免疫分析法、免疫色層分析法

英文摘要

As the international close commercial link, modern transportation, and the impact of global warming, vector-borne infectious diseases have gradually invaded to new geographic territories and the number of cases has also increased rapidly. Rapid and accurate diagnosis of arbovirus infection contributes greatly to disease surveillance, patient management in hospitals and control measures in public health. The main objective of this project is to develop ELISA- and immunochromatographic test (ICT)-based hanta antibody detection kits. ICT-based detection kits can offer faster, cheaper and more efficient than traditional laboratory. Rapid point-of-care testing for specific detection Zika, Japanese encephalitis and chikungunya infection during late-acute and convalescence phase in order to implement clinical treatment and control measure in public health.

Keyword: arbovirus, ELISA, immunochromatographic test,

前言

1. 政策或法令依據：

茲卡、日本腦炎及屈公病是台灣最主要的蟲媒性傳染病，茲卡則為亞洲再浮現的蟲媒性傳染病，三種疾病均歸類為第二類及第五類法定傳染病，依規定應於發現疑似病例二十四小時內通報。

2. 問題狀況或發展需求：

由於國際間交通往來日益頻繁及溫室效應影響，病媒性傳染病在全世界散佈情形正急速增加，發生頻率日益頻繁與嚴重，其中又以蚊蟲（mosquito）及壁蝨（Tick）所媒介的節肢動物媒介病毒（arthropod-borne viruses, Arbovirus）傳染病最為重要(1-6)。目前歸類為節肢動物媒介的病毒有 500 多種，其中超過 100 種可感染人類，主要為黃病毒（flaviviruses）及阿爾發病毒（alphaviruses）。由黃病毒引起的主要疾病為登革熱（dengue fever）、茲卡(Zika)、黃熱病（yellow fever）、日本腦炎（Japanese encephalitis）、西尼羅熱/腦炎（West Nile fever/encephalitis）及壁蝨腦炎 (Tick-Borne Encephalitis Virus, TBEV) 等；由阿爾發病毒引起的主要疾病為屈公病（Chikungunya）、羅斯河病毒病（Ross River virus disease）、東方馬腦炎（Eastern Equine encephalitis, EEE）、西方馬腦炎(Western Equine encephalitis，WEE)及委內瑞拉馬腦炎(Venezuelan equine encephalitis，VEE)

等。

由於節肢動物媒介病毒，特別是 2016 開始引起全球關注，會在胎兒引起小腦症及在成人引起 **Guillain-Barré syndrome** 的茲卡病毒，是目前全球最重要的病媒性傳染病。茲卡 2007 年第一次在雅浦島爆發小規模流行，之後在 2015 年巴西報導相關疫情並提出會引起嬰兒的小腦症後，引發全球譁然與關注。目前已橫跨非洲、美洲、亞洲及太平洋區，尤其目前美洲與東南亞疫情日益嚴峻。屈公病為近年來在非洲及亞洲造成許多疫情的再浮現病媒性傳染病。屈公病 2004-2005 在非洲及西印度洋島嶼開始爆發疫情後，病毒已由印度傳播至東南亞許多國家並造成流行(4-6)。茲卡、屈公病毒及黃熱屬病毒主要是由埃及斑蚊所傳播，其次是白線斑蚊。埃及斑蚊在台灣分佈於北迴歸線以南的各縣市，白線斑蚊則分佈於全台灣。目前在印度及東南亞國家流行的屈公病毒株很有可能已變異為更適合於白線斑蚊體內繁殖並藉由其傳播的病毒株，這些病毒株的出現有可能對台灣造成更嚴重的威脅及更廣泛的流行。

目前實驗室診茲卡、日本腦炎及屈公病的檢驗方法包含細胞培養分離病毒（約 7 天）、RT-PCR（以 real-time RT-PCR 為主、約 5 小時）、酵素免疫分析法（以 capture IgM/IgG ELISA 為主、約 4 小時）、免疫螢光抗體分析法（immunoflouorescent antibody assay、IFA、約 4 小時）及色層免疫分析法(Immunochromatography test、ICT，約 15-30 分鐘)，其中 real-time RT-PCR 係檢測急性期病毒核酸（1-7 天），由於 real-time RT-PCR 具有高靈

敏度及快速等優點，已取代病毒分離培養法成為急性期的標準檢驗方法，但也有價格昂貴且操作複雜等缺點，須特定實驗室方可進行。IFA 與 IgM/IgG ELISA 係檢測恢復期（感染後 5-30 天）IgM 及 IgG 抗體，具有高靈敏度，但操作複雜，也須特定實驗室方可進行。利用色層免疫分析法為原理製作的快速檢驗試劑，可於 15-30 分鐘內檢測出急性期血清病毒抗原及恢復期血清 IgM 及 IgG 抗體。快速檢驗試劑具有簡單、快速和無需儀器的優點，很適合用於臨床上 Point of care 之現場(on-site)篩檢，具有很高的實用價值。

本計畫目標在開發以免疫色層分析法為基礎的茲卡病毒、日本腦炎及屈公病等 arbovirus 整合型抗體快速檢測試劑，研發自製的快速檢測試劑可提升後急性期及恢復期的血清檢驗的靈敏度、降低檢驗價格、檢驗試劑的來源也不虞匱乏。我們最終目標是希望未來能於機場發燒篩檢及醫療院所同進行多種 arbovirus 抗體的同步檢測，有效阻止境外疾病的引進與本土化。例如結合登革熱抗體與抗原的快篩試劑(有市售試劑)，對於 12.1% PCR(-)，IgM/IgG (+)的可能病例（probable case，其中包含二次感染個案），可由 NS1 Ag test 與 IgM/IgG 的陽性結果，判定為確定病例，增加登革熱後急性期血清檢驗的靈敏度。

3. **國內外相關研究之文獻探討：**

應用免疫色層分析法技術發展出的快速檢測試劑最早出現於 1988 年

的驗孕試劑。至今已有許多不同的檢測試劑發展出來，如藥物、農藥、醫學、傳染病等檢測。

快速免疫色層分析法常用於傳染病病原體蛋白質抗原或抗體的檢測，其原理如下：檢測試劑主要由幾種元件組成，包括樣品墊（sample pad）、結合墊（Particle conjugate pad）、薄膜試紙（Nitrocellulose membrane）、吸收墊（Absorbent pad）與底卡。使用噴印設備將測試線（Test line）與控制線（Control line）塗佈於薄膜試紙上，各種元件組裝切割後即完成。其測試原理與一般免疫分析法相同，但檢測方法非常簡單，只需將檢體滴入檢測試劑上，幾分鐘內即可獲得結果。目前市面已售之傳染病快速檢測試劑包括 Influenza virus、AIV、SARS、Dengue virus、Adenovirus、Epstein-Barr virus、HBV、HIV、M. tuberculosis 等。因為 ELISA 方法與快速免疫色層分析法之基本原理相似，所以可以利用 ELISA 方法來篩選免疫色層分析法的所需的試劑，並評估其靈敏度及專一性。由於高靈敏度及專一性的快速診斷試劑，一直是大家所努力與希望達成的目標與趨勢，故有必要儘速發展傳染病之快速診斷試劑。

4. 本計畫與防疫工作之相關性：

由於全球溫室效應影響，病媒性傳染病在全世界散佈情形正急速增加。茲卡、屈公病及黃病毒屬病毒，是台灣地區最重要的病媒性傳染病，近年來病例都有持續增加的趨勢。早期通報、早期診斷、早期治療與早期

防治是病媒性傳染病的重要防治策略與方法。透過各種監測系統，加強發燒病患通報，快速檢驗，即時掌握急性期感染的確定病例，可有效防止病毒藉由病媒蚊的傳播而蔓延，有利於疫情的及時監測與緊急防治措施。

應用免疫色層分析法為基礎的快速檢測試劑，其最大的優點是不需特殊的儀器，操作簡便，能迅速得到檢測結果。有助於快速檢測出傳染病種類，及早實施防疫工作，對病人實施正確的醫療照顧，對傳染病的防治工作有極大的幫助。

材料與方法

本計畫之實施方法主要分為六部分：（一）血液檢體、組織之收集；（二）基因重組蛋白之置備與純化；（三）融合瘤之製備；（四）單株抗體之篩選；（五）以 AP/HRP 酵素標誌單株抗體與重組基因蛋白；（六）ELISA 快速檢測試劑之製備與分析；（七）ICT 快速檢測試劑之製備與分析，茲將實驗方法分述如下：

（一） 血液檢體、病毒株之收集：血液檢體來源為疾病管制署之各種黃病毒及阿爾發病毒傳染病之驗餘血清。病毒株為疾病管制署歷年來以細胞培養方法分離所得者。病人血清檢體包括急性期(症狀出現後 0-7 天)、早恢復期(症狀出現後 8-13 天)、晚恢復期(症狀出現後 14-30 天)之檢體。病人檢體收集後，將進行病原分離、血清學及分子生物學之實驗室診斷，以確認感染源。不同期血清，將用以分析病人血清中抗原的含量或對各種抗原之抗體反應，如抗體之效價、種類、特異性及動力學變化。經實驗室確診為陽性反應之檢體將加以分裝，儲存於 -80℃冷凍櫃長久保存。

（二） 基因重組蛋白之製備與純化：

(1) 基因重組蛋白質之製備：將 ZIKV E domain III 與 NS1 蛋白、

日本腦炎 GI/GIII 膜蛋白，及屈公病毒（CHIKV）膜蛋白 E1、E2 (i)利用 RT-PCR 或 PCR 得到蛋白質的 DNA 片段，並於 5’端與 3’端加上 Bam HI 及 Hind III 限制酶切位，將此 DNA 片段利用限制酶選殖至昆蟲細胞桿狀病毒載體表現載體上，此表現系統是利用昆蟲桿狀病毒 (baculovirus) 作為外源基因的載體，帶有重組基因的桿狀病毒感染昆蟲細胞可生產大量的重組蛋白。因昆蟲細胞為真核細胞，在表現蛋白後會進行轉譯後修飾，因此可用來生產醣蛋白。並具有產量高，基因產物不論是原核或真核細胞，或是病毒皆可表現的優點，此系統常應用在疫苗生產或生物製藥。本實驗所使用的昆蟲細胞 Sf-21 是購自 Clontech 公司，昆蟲細胞-桿狀病毒載體表現系統是採用 Bac-to-Bac Baculovirus expression system (Invitrogen)，使用 RT-PCR 法大量複製茲卡病毒 ZIKV、日本腦炎 JEV、屈公病 CHIKV 的膜蛋白 (envelope) 基因序列，以限制酶選殖法將膜蛋白基因接在 pFastBac 載體上，送至明欣生物科技公司定序，確認接到載體上的基因正確無誤後，以轉型作用 (transformation) 送入 DH10Bac *E.coli* 勝任細胞 (Invitrogen)。將勝任細胞塗抹在含有 50 g/ml kanamycin、10 g/ml tetracycline、7 g/ml gentamycin、100 g/ml Bluo-gal、40 g/ml IPTG 的固態培養基，以鋁箔紙包覆放入 37℃ 培養箱 48 小時，挑選單一白色菌落，以 Pure Link HiPure Plasmid DNA

Miniprep Kit (Invitrogen)抽取純化 DH10Bac 內的重組 Bacmid DNA，使用 M13 引子進行 PCR 鑑定 DNA 長度，成功重組的 bacmid 之 PCR 產物為 2.3 kb 與插入外來基因的總和，沒有重組的則為 300 bp。取 1 g 重組 bacmid 與 10 l Cellfectin II (Invitrogen) 和 0.5 ml Grace's medium 震盪混和，靜置室溫 1 小時後加入 8×10^5 Sf-21 細胞，在 27℃培養 5 小時，之後加入 2 ml 含有胎牛血清的 X-press medium (clontech) 取代原本的混和液，繼續培養 96 小時。收取上清液即為第一代重組病毒液 (P1 baculovirus stock)。取 500ul 重組病毒液感染 2×10^6 Sf-21 細胞，在 27℃培養 96 小時，收取上清液即為第二代重組病毒液 (P2 baculovirus stock)。此動作可增加重組病毒的力價。使用 BacPAK qPCR Titration Kit (clontech) 計算重組桿狀病毒力價，步驟為取 200ul 重組病毒液，以 NucleoSpin® Virus Kit 純化重組病毒 DNA，之後將 BacPak 引子、ROX 螢光染劑、酵素混和後以 qPCR 測定，得到的讀值將與已知力價的標準品 baculovirus 作比較，得到重組桿狀病毒力價。取 MOI = 10 的重組桿狀病毒感染 6×10^6 Sf-21 昆蟲細胞，在 27℃ 培養 72 小時，之後將感染後的細胞與培養基收集在 50 ml 離心管，離心 3500 rpm、30 分鐘，分離出上清液 (培養基) 與細胞，以 SDS-PAGE 和 Western blot 分析重組蛋白的表現情形。(ii) 利用大腸桿菌(Escherichia coli)

可提供便宜、快速且能大量生產蛋白質的多種優點（Gold, 1990)，採用大腸桿菌(Escherichia coli) 表現重組蛋白質。首先利用 RT-PCR 或 PCR 得到蛋白質的 DNA 片段。將此 DNA 片段選殖至 pET 表現系統(Novagen)，產生 N 端（或 C 端）為 His-tag 的全長 424a.a.長的重組蛋白質。利用 Anti-His-tag mAb (正對照組)、Anti-E mAb、Anti-CHIKV mAb 等，決定重組蛋白質是否帶特異的抗原決定位置(Western blot, Immunoprecipitation)。再大量表現、純化，並利用 ELISA 的方法評估其發展 ELISA 及 ICT 檢驗試劑之可能性。

（三）融合瘤之製備：

(1) 茲卡及日本腦炎病毒、屈公病毒之純化：ZIKV、JEV 及 CHIKV 來自於受病毒感染 Vero 細胞之病毒細胞培養液。此病毒細胞培養液先經 PEG 將 ZIKV、JEV 及 CHIKV 病毒沉澱，經離心取得沉澱物，將沉澱物回溶於 TNE buffer (Tris-NaCl-EDTA, PH7.4)，此為經過部分純化之病毒抗原。再將此抗原以 discontinued sucrose density gradient centrifugation (sucrose gradient 10%-50%; 離心 39K rpm, 4 ℃，2 hr)純化出病毒顆粒。

(2) 茲卡病毒 NS1 抗原（ZIKV NS1 Ag）之純化與分析：將茲卡特異

性抗 NS1 蛋白質之單株抗體;Anti-Zika NS1 Ag mAb)，利用 protein A 親和性層析管柱，純化出單株抗體，再將此單株抗體之糖分子氧化後與 Affi-Gel 連結，製備成 NS1 抗體免疫親和性層析管柱備用。NS1 抗原在純化前先經前處理：NS1 抗原來自於 ZIKV 感染 Vero 細胞之病毒細胞培養液，進一步以 Centricon Plus-10 Centrifugal Filter Devices 加以濃縮，步驟如下：首先將病毒液置入濃縮管中，以 3500rpm 離心 10 分鐘，去除分子量小於 10 kDa 之蛋白質。離心後，再將 Filter 與 retentate cup 接合後倒置，以<2000 rpm 之轉速離心 10 分鐘，retentate cup 內之液體即為 NS1 抗原之濃縮液。再加入 PEG 將 ZIKV 病毒沉澱，經離心所取得的上清液，即為經過部分純化之 NS1 抗原，再將此 NS1 抗原與製成的 NS1 抗體免疫親和性層析管柱做結合，經清洗、純化出 NS1 抗原，再以光譜儀及蛋白質分析法定量 NS1 抗原含量，並保存於-80℃冰箱中。此 NS1 抗原再經 10% SDS-PAGE 分析，確定抗原分子量之大小及純度。

(3) 將五至六週齡之 BALB/c 雌性小鼠經由腹腔內或皮下注射約 20-50 g 的 10^6 PFU 去活性、純化之 ZIKa E domain III 與 NS1 蛋白，加等體積之 Freund's complete adjuvant(Sigma)。分別間隔三週後，使用相同抗原，再追加免疫注射二次，但改用 Freund's incomplete adjuvant。第四次免疫時，採用靜脈注射，使用不加佐劑之抗原。

免疫四次後之小鼠抽取其尾巴血，以免疫酵素法（ELISA）測定血清中抗病毒抗體之效價。將高效價小鼠之脾臟細胞以無菌技術取出後和 FO 骨髓瘤細胞在含有 PEG 之溶液中進行融合，再經含有 HAT （H–hypoxanthine； A–aminopterin；T - thymidine）之培養液培養 7-14 天後，以 ELISA 方法篩選出會分泌抗 ZIKV 或 CHIKV 抗體的融合瘤細胞。再以限制稀釋法（limiting dilution）進行單一細胞培養成單株細胞，再重覆進行 ELISA 篩選出分泌抗 ZIKV 或 CHIKV 單株抗體的融合瘤細胞株。詳細步驟如下：FO 細胞應於細胞融合前 4~7 天增殖培養，使 FO 細胞在細胞融合當天的生長處於對數期 (log phase)，且細胞數目需大於 3×10^7。取出小鼠的脾臟細胞直接以 RPMI 培養液清洗 3 次後，將它和 FO 骨髓癌細胞混合，在 50 ml 離心管中小心把細胞離心下來，倒掉上清液後以殘留的 RPMI 將細胞打散，放在 37℃內保溫準備加入 PEG 1500 (polyethylene glycol) 進行細胞融合。在 1.5 分鐘內慢慢加入 1.5 ml PEG，同時一邊輕輕搖動讓 PEG 均勻的與細胞混合。靜置 1.5 分鐘後，在 5 分鐘內緩緩加入 5 ml RPMI，邊加邊混勻；再於 2 分鐘內加入 20 ml RPMI。再以離心去除上清液後，緩緩加入 45 ml HT medium，把細胞均分到 6 個 96 孔培養盤中，每孔加約 2~3 滴（約 75 l）細胞懸浮液。培養一天後，加入等量的 H2AT medium。培養第三天後置換 75 l HAT medium，每 3-4 天置換一次，當控制

組的 FO 細胞死亡後，置換成 75　l HT medium，每 3-4 天置換一次。最後每孔只剩下 1 或 2 個穩定細胞群落，再以 ELISA 篩選抗體效價較高者，將該細胞株以限制稀釋法稀釋，每孔中只含有一個細胞，待其生長成群落後再用 ELISA 篩選抗體效價較高者，即為單株抗體融合瘤，經大量培養後，保存至液態氮中。

（四） 單株抗體之篩選：由於 ELISA 檢測系統的專一性及靈敏度皆高，故採用此方法作為快速篩選抗體之檢測系統。首先將純化出之 E 與 NS1 Ag （affinity column purified 或重組蛋白抗原）或病毒顆粒用 pH9.6 carbonate buffer 吸附在 96 microtiter well immunoassay strips，4℃隔夜後，以 1% BSA 進行 Block，37ºC 反應一小時，清洗 3 次後，以 PBST（PBS-0.5%Tween20-1%BSA-2.5%NRS）稀釋待測檢體及陽性、陰性控制組檢體，置於 37ºC 保溫箱中震盪半小時。清洗 3 次，加入山羊抗小鼠 IgG-alkaline phosphatase 二次抗體 (Goat anti-mouse IgG AP)作用於 37ºC 保溫箱中震盪半小時，清洗 3 次。每孔中加入 100ul pNPP 呈色劑，置於室溫及暗處呈色反應約 30-60 分鐘，最後以 ELISA 吸光儀讀取波長 405nm 及 620nm 吸收光。

（五）以 AP/HRP 酵素標誌單株抗體與重組蛋白：單株抗體以 BALB/c 小白鼠之腹水方式生產，再以 protein A cartridge 親和力管柱(Bio-Rad

Labortories)純化；。單株抗體以 AP/HRP 酵素標誌。Lightning-Link (Innova Biosciences，UK)是以共價鍵結，辨視蛋白質/抗體/胜肽的 amino groups (lysin/a-amino)來進行標誌反應，以 100ug 的單株抗體與 100ug 的 Lightning-Link-AP 或以 2~400ug 的單株抗體與 100ug 的 Light-Link-HRP modifier 在室溫下反應至少 3 小時後，再以 Quencher reagent 化學反應徹底中止殘餘　　應及停止非專一性結合，之後加入 40-50%抗凍劑(glycerol)冷凍保存。

（六） ELISA 快速檢測試劑之製備與分析：

(1) Capture IgM/IgG 酵素免疫分析法: 先以 100μl 抗人 IgM 或 IgG 特異性之山羊 IgG (goat IgG against Human IgM or IgG)在 4℃下隔夜吸附 (coating)在 96 孔微量效價盤上。吸附完成後以磷酸緩衝液(PBS)清洗，再用 200μl 之 1% 牛血清白蛋白緩衝液(1% Bovine serum albumin in PBS)於 37℃下進行 1 小時 blocking 作用。以 PBS 清洗後，加入 1:100 稀釋好的待測血清及對照組血清 100μl 反應 1 小時。清洗後，加入 1:1000~2000 稀釋的 AP/HRP 酵素標誌單株抗體與病毒反應完的複合物 100μl，在 37℃下反應 1 小時。以 PBS 清洗後，最後加入 100μl 酵素受質體 PNPP (p-nitrophenyl-phosphate) ，置於室溫及暗處呈色約 30-60 分鐘，再用微量效價盤判讀儀 (microplate reader) 讀取波長 405nm 及

620nm 吸收光。

(2) Indirect IgM and IgG ELISA:先以 1μg/ml, 100 μl/well of 重組蛋白在 4℃下隔夜吸附(coating)在 96 孔微量效價盤上。再用 200μl 之 1% 牛血清白蛋白緩衝液(1% Bovine serum albumin in PBS)於 37℃下進行 1 小時 blocking 作用。以 PBS 清洗後，加入 1:100 稀釋好的待測血清及對照血清反應 1 小時。再加入 1:1000 稀釋之山羊抗人 IgM 或 IgG 抗体-鹼性磷酸脢結合体，於 37℃反應 1 小時。最後加入酵素受質體 PNPP，於室溫作用 30-60 分鐘分鐘，再以波長 405 nm 測吸光度。

（七） ICT 快速檢測試劑之製備與分析：

(1) 原理：快速免疫色層分析法檢測試劑主要由幾種元件組成，包括樣品墊（sample pad）、結合墊（Particle conjugate pad）、薄膜試紙（Nitrocellulose membrane）、吸收墊 （Absorbent pad）與底卡。使用噴印設備將測試線（Test line）與控制線（Control line）塗佈於薄膜試紙上。通常先由樣品墊與結合墊緊密貼合，再與薄膜試紙接合，加上吸收墊，各種元件組裝後，切割至適合尺寸後即完成。其測試原理與一般免疫分析法相同，可用於檢測抗原及抗體。檢測方法簡單，只需將檢體滴入檢測試劑上，幾分鐘內即可獲得結果。

(2) 樣品墊：依檢體種類選擇樣品墊材料，其目的在控制檢體流速，使檢體均勻分佈。

(3) 結合墊：可使用 BioDot 出產之 AirJet，將 colloidal gold、monodisperse latex 或 paramagnetic particle conjugates 噴灑於上。可根據檢測方法，將抗原或抗體與上述材料接合，依 conjugates 種類選擇結合墊材料。Conjugate solutions 通常含有高濃度的 sugars and/or polymers 作為安定劑。

(4) 薄膜試紙：依實驗測試原理，可使用 BioDot 出產之 Front line 或 BioJet 將抗原或抗體塗佈於 Nitrocellulose membrane 之測試線（Test line）與控制線（Control line）位置。

(5) 樣品墊、結合墊及薄膜試紙通常需要經過前處理及後處理步驟使其親水性增加、使塗佈其上的蛋白質及薄膜的結構穩定性增加，並防止 non-specific binding。可使用 AirJet Quanti 或經浸泡及高效能烘乾步驟達成。

結果

(一)建置病媒病毒外套膜及非結構基因-1 重組蛋白質體

利用 gene cloning 方法在 baculovirus 或 E. coli 表現系統上，建置含有茲卡病毒及屈公病毒外套膜(E)基因重組蛋白質及茲卡病毒的非結構性 1(NS1)基因重組蛋白的質體基因庫。經生產與純化後可用做酵素免疫分析法(ELISA)及免疫色層分析法(ICT)為基礎的快速檢驗試劑檢驗。

(二)茲卡病毒 E Full length 與 E Domain III 重組蛋白質之製備：

利用大腸桿菌系統表現欲生產之重組蛋白:利用帶有 SUMO、Tsf 與 MBP 等 tag 的 E.coli 系統表現的茲卡病毒 E Domain III 重組蛋白，並以 anti-His 單株抗體確認表現的蛋白的分子量，如圖一(1)。再以市售 Zika anti-E polyclone Ab 及中研院製備之 ZK-001 抗體進行 western blot，確認表現的蛋白為 Zika E DIII，如圖一(2)。分別以病毒培養液及陽、陰性病人血清檢體做 western blot 所得的結果，如圖一(3)。可以辨識到茲卡與日本腦炎病毒的病人血清檢體，可能因兩者的外套膜(E)序列有一定相似性造成無法識別;但與其他登革及屈公病毒陽性檢體則呈現陰性反應，顯示此蛋白片段具識別性。並在進一步的 Indirect IgG ELISA 測試中發現可偵測到對茲卡病毒特異性 IgG 抗體，成功識別檢體是否感染 Zika 病毒，如圖五(1)，但 IgG 抗體出現在發

病後的較晚期，較不具啟動早期防治的效果。但在 capture IgM ELISA 的分析中則發現 Zika E DIII 效果並不如預期，故同時開發 Zika E Full length 的重組蛋白，如圖二(1)。圖二(2)則為分別以茲卡病毒培養液及陽、陰性病人血清檢體所做 western blot 分析，結果顯示能檢測到所有感染茲卡病毒的血清檢體，但同時又與其他黃病毒屬的登革及日本腦炎病毒陽性病人血清檢體也有反應，故無法有效區分出檢體是遭受何種病原體感染，而相同的情況也發生在 capture IgM ELISA 的檢測中，如圖五(2)。希望能藉由對茲卡病毒有高專一性及高親和性的單株抗體來解決這個問題。

(三)茲卡病毒非結構性蛋白一(NS1)重組蛋白質之製備：

圖三為利用原核細胞培養系統進行表現茲卡病毒 NS1 重組蛋白，並以市售 anti-NS1 單株抗體確認表現的蛋白的分子量，圖三(1)、(2)。並以此蛋白注射鼠隻以進行置備融合瘤細胞及篩選高專一性單株抗體。先進行大腸桿菌培養系統表現蛋白，是因操作條件較為單純且產量高，但原核細胞培養系統雖易於操作卻無法進行真核蛋白的轉譯後修飾，所以醣蛋白不能有正確的折疊，必須另外使用特殊的程序使其重新折疊，這不但增加成本，也常效果不如預期，故利用桿狀病毒-昆蟲細胞蛋白表現系統來生產 NS1 蛋白，圖四(1)。圖三(3)及圖四(2)則為利用原核與真核系統所產出的 NS1 蛋白，分別與陽、陰性病人血清檢體進行 western blot 測試，結果顯示真核細胞所生產的 NS1 蛋白對茲卡病毒的

專一性與靈敏度較高，可能是由於蛋白構形有正確摺疊的關係。並會嘗試結合 Zika E 與 NS1 蛋白來測試是否能增加偵測 IgM 抗體的專一性。

(三)置備茲卡外套膜(E/E DIII)與非結構性蛋白-1(NS1)融合瘤細胞與單株抗體之篩選：

以茲卡病毒的 E Full length 與 E DIII 及 NS1 分別進行 4-5 次注射後進行融合瘤實驗，從 20-30 的 96 孔盤之融合瘤細胞中用 ELISA 篩選出陽性細胞株。篩選出之陽性融合瘤細胞再用 limiting dilution 方法稀釋，重新在 96 孔盤中培養（每孔中最多只含有一個細胞），待其生長成群落後，再篩選出抗體效價較高者。圖六(1)、(2)、(3)分別為以茲卡 E/ E DIII /NS1 蛋白抗原免疫小鼠所得到的單株抗體進行篩選的結果，目前有篩選到 3 株茲卡 E DIII(5B7.1、5B7.2、5D10.1)與一株 NS1(2D9.7)單株抗體，並先以 5B7.1 單株抗體做 westerm blot 分析，確認可以辨認到 E (FL)/E DIII 抗原，如圖六(4)、(5)。之後會將選出之單株抗體融合瘤細胞注射入小鼠腹腔中，以生產高濃度之單株抗體腹水（ascites）。單株抗體腹水以 protein A 親和性層析管柱，純化出單株抗體。純化之單株抗體可吸附於 ELISA plate/stripe 作為 capture monoclonal antibody，或與 enzyme、colloidal gold 等聯結作為 tracer antibody，建立 ELISA 或 ICT 抗原檢測試劑；Zika Full length Envelope(E(FL)) 的融合瘤細胞正在進行篩選單株抗體中。

（四）屈公病毒外套膜 E1/E2 重組蛋白質之製備：我們利用 gene cloning 方法分別在 baculovirus 上生產含有 50 kd 屈公病毒 E1/E2 基因重組蛋白質，經純化後可用於 ELISA 或 ICT 等為基礎的快速檢驗試劑檢驗。因之前昆蟲細胞生產之重組蛋白只表現在細胞內，但純化過程不順利。所以重新建置以昆蟲細胞生產 6KE1/E3E2 重組蛋白(如圖七(1))，並與本實驗室以屈公病毒抗原免疫小鼠，與篩選出的單株抗體(5C5.2、3E12F、1B1.2.1、4A1.1 及 4F4.3 等，如圖七(3))作用後的結果，如圖七(2)。

討論

茲卡、屈公病與登革熱等病媒病毒傳染病並非台灣本土性的流行疾病，其中登革熱與屈公病的流行主要是由境外移入的病毒入侵，而造成本土的疫情。由於近年來全球升溫導致病媒病毒傳染病有持續增加的趨勢，因此發展快速又靈敏的 arbovirus 診斷與監測系統，以期早期診斷及防治，是實驗室努力的目標之一。目前疾管局茲卡及屈公病檢驗包括三個項目：病毒分離、病毒核酸分子檢測、及 IgM/IgG 抗體檢測。登革熱 NS1 抗原檢測於 2008 年六月開始在機場發燒篩檢實施，所使用的試劑是 ICT 型式的快速檢驗試劑。由於機場的發燒篩檢站可以檢測出處於急性期的、發燒的登革熱境外移入病例，所以在機場使

用 NS1 Ag ICT test 可以減少臨床與實驗室診斷的時間差距，一旦病例確定後，可即時啟動防治措施，有效的防止境外移入的傳染病造成本土的傳播及流行。故開發出同時檢測並可進行識別屈公病、茲卡與登革熱的整合型 arbovirus 快速檢驗試劑，則可同時在機場檢驗境外移入的疑似病例，更能有效的防止 arbovirus 的入侵及流行。

研發自製的病媒病毒快速檢測試劑除了為提升急性期血清檢驗的靈敏度外，還有許多優點，包括可降低檢驗價格、檢驗試劑的來源也不虞匱乏。本計畫重點為接續發展茲卡、日本腦炎及屈公病外套膜(E)重組蛋白，再經大量純化或與單株抗體組合開發出抗體快速篩檢試劑。但目前製備的茲卡病毒外套膜第三區域蛋白(E DIII)是根據國際期刊 CELL 的刊載建議，認為以外套膜第三區域蛋白注射小鼠所得到的抗體對茲卡病毒有較高的專一性，即降低與其他黃病毒屬抗原的交叉反應；但同時進行製備全長的外套膜蛋白及融合瘤細胞株，希望藉由兩者截長補短的搭配來提升茲卡檢測試劑的靈敏性與專一性。而利用昆蟲桿狀細胞生產的 NS1 重組蛋白則是因蛋白在轉譯後需進行醣化修飾，故真核系統產量雖然較低，但蛋白質的構形可能與 native 較為相似;原核生物系統產生的蛋白則大都形成不可溶的包涵體，需再經過 refolding 過程後才能作用，而構形就決定了與抗原的結合鍵結的親和性。故以昆蟲細胞生產重組蛋白作為生產茲卡 NS1 抗體 ICT 的原料來源，但因產量低，系統較不穩定，大量生產與濃縮純化是需面臨的另

一個考驗。測試成功後，希望能成功開發整合型偵測 arbovirus 抗體的快速檢測試劑或合併屈公病、茲卡的抗體與抗原快篩試劑，這可以用來提早判定 PCR(-)，IgM/IgG (+)的可能病例（probable case，其中包含二次感染個案）。快速檢測試劑，除了使用方便，能快速獲得檢驗結果。期望將來能應用發整合型 arbovirus 抗體的快速檢測試劑於機場發燒篩檢及醫療院所，對疑似病例進行快速檢驗，這診斷與監測系統將有助於病媒病毒疾病的防治工作。

在屈公病毒檢測部分，目前除篩選出的屈公病單株抗體 1B1.1，做為實驗室屈公熱例行性抗體檢測，每年都可經由 IgM/IgG 抗體檢測篩出境外移入屈公病患，重組蛋白的部分則可用於開發偵測 IgM/IgG 抗體的快速檢測試劑。

開發整合型 arbovirus 的抗體/抗原快速檢測試劑，可根據 Ag test 與 IgM/IgG 的陽性結果，快速識別感染何種病原體。這除了使用方便，能快速獲得檢驗結果外，確實可增加急性期血清檢驗的靈敏度。

最終期望完成(1)開發屈公病與茲卡抗原及抗體結合的快速檢驗試劑，應用於急性期之感染。(2) 開發 arbovirus 抗體快速檢驗試劑，應用於後急性期與恢復期之感染。(3)可將其應用於病媒病毒感染之相關研究。應用這些病媒病毒快速檢驗試劑於機場發燒篩檢及醫療院所，對茲卡、屈公熱等病媒性傳染病疑似病例進行快速檢驗，這診斷與監測系統將有助於病媒性傳染病的防治工作。

結論與建議

良好的檢驗試劑，需經由不斷的改良與試驗，以增加檢驗的專一性及靈敏度，並同時能檢測出不同血清型別、不同地理區域之病毒株，使之更可靠的應用於病媒病毒的例行性檢驗。在病毒株不斷的演化，新的病毒株不斷的出現下，需持續提升診斷試劑的靈敏度。由於研發過程長，需時間與有經驗的人才，及有長期的研發策略，以因應未來的發展。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 由於全球溫室效應影響,病媒性傳染病在全世界散佈情形正急速增加。茲卡病毒、登革病毒及屈公病毒等 arbovirus 所引起的疾病，是台灣地區重要的境外移入病媒性傳染病,近年來病例都有持續增加的趨勢。本計畫在應用免疫色層分析法技術(ICT)與酵素免疫分析法(ELISA)，開發病媒病毒快速檢驗試劑，以發揮及時檢測(On-site)的優點，可應用於機場發燒篩檢及醫療院所(Point of Care Testing)。將有助於防止境外移入與本土擴散，並幫助病人的及時診斷與治療。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果
加強衛教宣導、實施病人自主管理、鼓勵醫師通報等防疫措施可及早發現病毒血症期的發燒患者，減少境外移入病毒的引進及本土擴散。對於境外移入的無症狀、無發燒之空窗期患者，因無法得知其感染，無法進行及時篩檢，更需要後續的監測與通報系統配合。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議
病媒病毒媒介的傳染病在全球升溫的環境下,須加強監控與鑑別診斷,未來應加強機場發燒篩檢監測，並配合實驗室為基礎的檢驗系統，有系統的進行各種病媒性病毒的監測、檢驗、與流行病學研究。未來可考慮製作 ICT 為基礎的快速檢驗試劑，在機場、港阜當地進行定期檢測監控，及在醫療院所使用快速檢驗試劑，及早檢驗出確定病例。

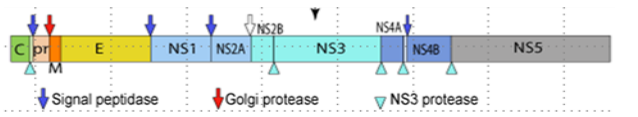
References

1. Powers AM, Logue CH, 2007. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. J Gen Virol 88: 2363-77.
2. Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M, 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. Lancet Infect Dis 7:319-27.
3. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C, 2009. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. Virology 25;393:183-97
4. Shu PY, Chien LJ, Chang SF, Su CL, Kuo YC, Liao TL, et al., 2005. Fever screening at airports and imported dengue. Emerg Infect Dis 11:460-2.
5. Zika virus WHO，http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/
6. Fagbami AH.Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State.J Hyg (Lond). 1979 Oct;83(2):213-9
7. Su CL, Yang CF, Chang SF, Shu PY . Molecular Epidemiology of Japanese Encephalitis Virus in Mosquitoes during 2013–2014. 疫情報導 2016;32:
8. Huang JH, LinTH, Teng HJ, Su CL, Tsai KH, Liang-Chen Lu, Cheo Lin, Yang CF, Chang SF, Liao TL, Yu SK, Cheng CH, Chang MC, Hu HC, and Shu PY Molecular Epidemiology of Japanese Encephalitis Virus, Taiwan . Emerg Infect Dis. 2010 May; 16(5): 876–878.
9. Haiyan Zhao, Estefania Fernandez, Kimberly A. Dowd, Scott D. Speer, Derek J. Platt, Matthew J. Gorman, Jennifer Govero, Christopher A. Nelson,Theodore C. Pierson, Michael S. Diamond,* and Daved H. Fremont. Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. , Cell (2016), http://dx.doi.org/ 10.1016/j.cell.2016.07.020

,

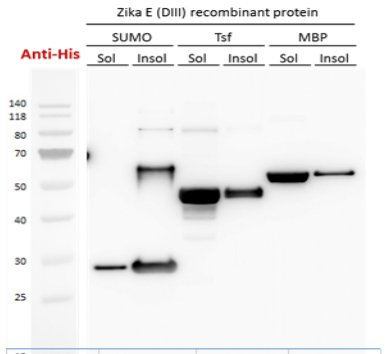
圖一 利用原核生物系統生產 Zika E Domain III(E DIII)重組蛋白

(1) ZiKa virus E(D III) recombinant proein



ZIKV PRVABC59_E (DIII) _Sequence

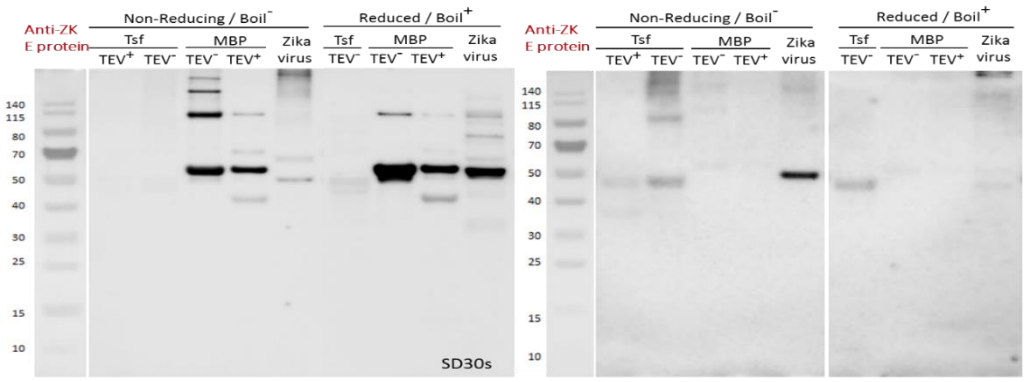
```
---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+
  1   AGATTGAAGGGCGTGTCATACTCCTTGTGTACCGCAGCGTTCACATTCACCAAGATCCCGGCTGAAACACTGCACGGGAC
 81   AGTCACAGTGGAGGTACAGTACGCAGGGACAGATGGACCTTGCAAGGTTCCAGCTCAGATGGCGGTGGACATGCAAACTC
161   TGACCCCAGTTGGGAGGTTGATAACCGCTAACCCCGTAATCACTGAAAGCACTGAGAACTCTAAGATGATGCTGGAACTT
241   GATCCACCATTTGGGGACTCTTACATTGTCATAGGAGTCGGGGAGAAGAAGATCACCCACCACTGGCACAGGAGTGGCAG
321   CACCATT

---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+
  1   RLKGVSYSLCTAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKVPAQMAVDMQTLTPVGRLITANPVITESTENSKMMLEL
 81   DPPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHRSGSTI
```



	pSol-SUMO	pSol-Tsf	pSol- MBP
Fusion tag	13.5	32.2	42.1
Zika-E-DIII	11.8	11.8	11.8
MW (kDa)	25.3	44	53.9

(2)

ZIKV_E (DIII) recombinant protein
Anti-Zika E protein Western blot (PVDF)

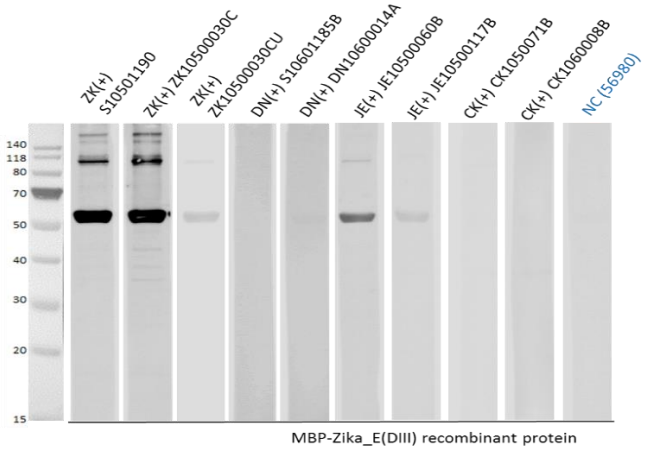


GeneTex (GTX133314)
Zika virus Envelope protein antibody
Rabbit Polyclonal antibody to Zika virus Envelope protein

Academia Sinica anti-Zika-001_6.25

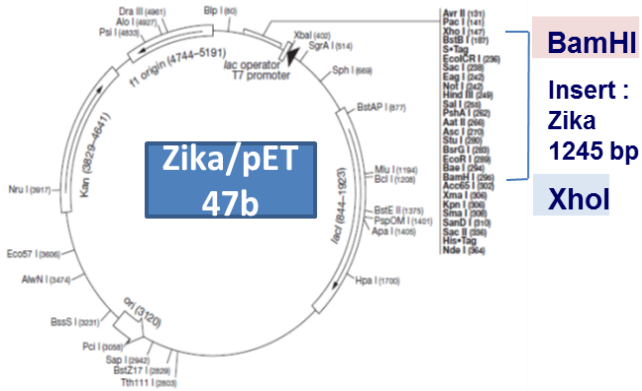
(3)

MBP-Zika_E(DIII) recombinant protein
Anti-serum Western Blot



圖二 利用原核生物系統生產 Zika E Full length 重組蛋白

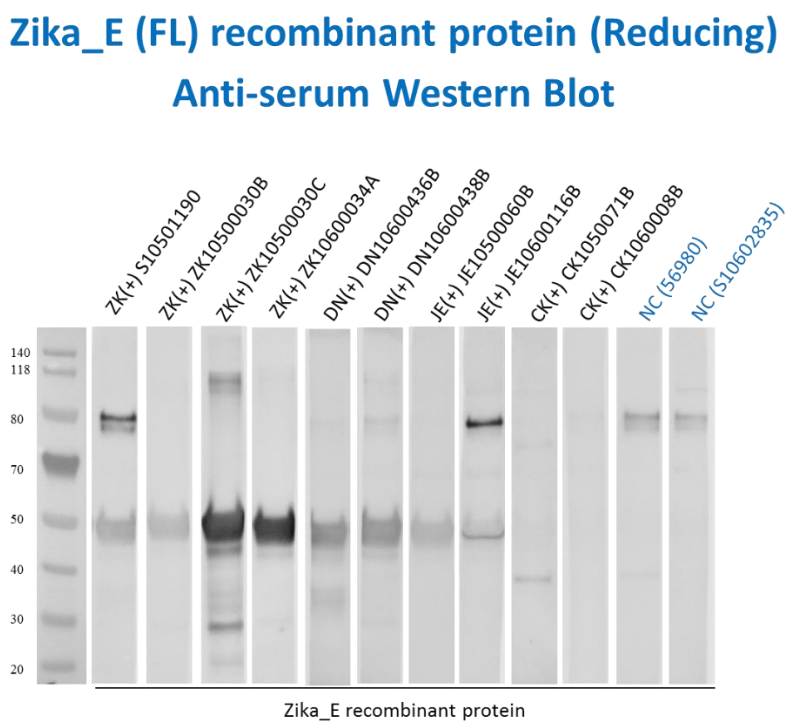
(1) ZiKa virus E (Full length) recombinant proein



1.Plasmid name	Zika Full length/pET 47b
2. Primer	BamH1 primer 5`-TACCAGGATCCGgatcaggtgcataggagtc XhoI1 primer 5`-AGCCTCGAGcacagtggcttcaaatgc
3. Insert	Zika
4. Size	1245 bp
5. Sequence result	100% identity
6.PCR (base pair)	1245 bp
7.SDS-PAGE(Kda)	50 Kda
8.Western(Ab)	Anti-His Ab, patient serum

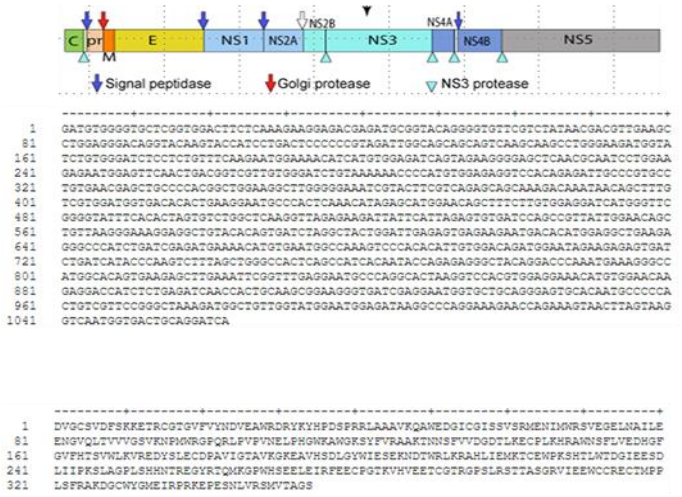
```
Query  1    IRCIGVSNRDFVEGMSGGTWVDVVLEHGGCVTVMAQDKPTVDIELVTTTVSNMAEVRSYC  60
Sbjct  1    IRCIGVSNRDFVEGMSGGTWVDVVLEHGGCVTVMAQDKPTVDIELVTTTVSNMAEVRSYC  60
Query  61   YEASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVDRGWGNGCGLFGKGSLVTCAKFT  120
Sbjct  61   YEASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVDRGWGNGCGLFGKGSLVTCAKFT  120
Query  121  CSKKMTGKSIQPENLEYRIMLSVHGSQHSGMTVNDIGYETDENRAKVEVTPNSPRAEATL  180
Sbjct  121  CSKKMTGKSIQPENLEYRIMLSVHGSQHSGMTVNDIGYETDENRAKVEVTPNSPRAEATL  180
Query  181  GGFGSLGLDCEPRTGLDFSDLYYLTMNNKHWLVHKEWFHDIPLPWHAGADTGTPHWNNKE  240
Sbjct  181  GGFGSLGLDCEPRTGLDFSDLYYLTMNNKHWLVHKEWFHDIPLPWHAGADTGTPHWNNKE  240
Query  241  ALVEFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVHTALAGALEAEMDGAKGKLFSGHLKCRLKMDKLRL  300
Sbjct  241  ALVEFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVHTALAGALEAEMDGAKGKLFSGHLKCRLKMDKLRL  300
Query  301  KGVSYSLCTAAFTFTKVPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKIPVQMAVDMQTLTPVGRLIT  360
Sbjct  301  KGVSYSLCTAAFTFTKVPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKIPVQMAVDMQTLTPVGRLIT  360
Query  361  ANPVITESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGVGDKKITHHWHRSGSTIGKAFEATV  415
Sbjct  361  ANPVITESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGVGDKKITHHWHRSGSTIGKAFEATV  415
```

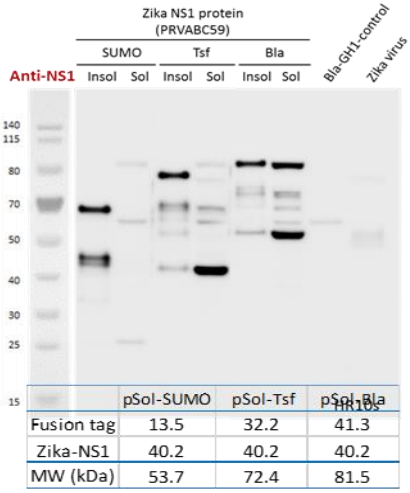
(2)



圖三 利用原核生物系統生產 Zika NS-1 重組蛋白

(1) Expression of recombinant ZiKa NS1 proein by expresso Solubility and Expression (E.coli)system

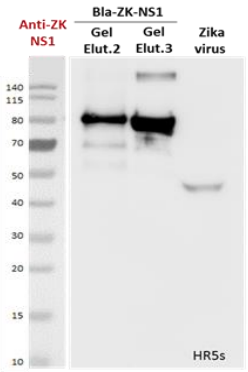




	pSol-SUMO	pSol-Tsf	pSol-Bla
Fusion tag	13.5	32.2	41.3
Zika-NS1	40.2	40.2	40.2
MW (kDa)	53.7	72.4	81.5

(2)

Bla-Zika_NS1 recombinant protein
Anti-Zika NS1 protein Western blot



GeneTex
Zika virus NS1 protein antibody

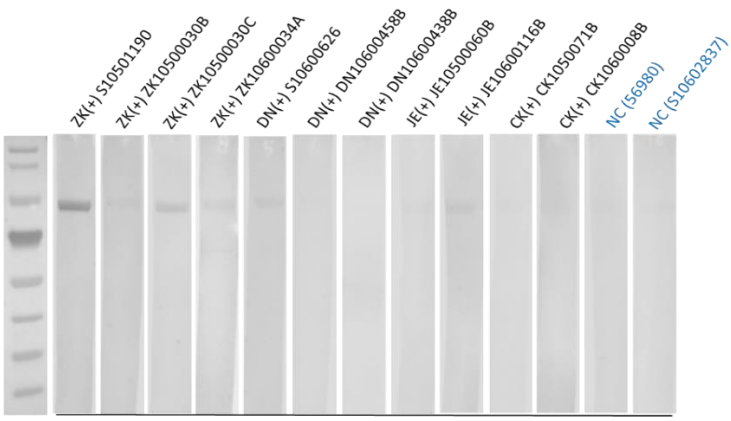
Specifications: Zika virus NS1 protein antibody

Product Description	Rabbit Polyclonal antibody to Zika virus NS1 protein
Synonyms	Zika virus NS1 protein antibody , Zika virus NS1 protein antibody
Host	Rabbit
Clonality	Polyclonal
Target	Zika virus NS1 protein
Isotype	IgG
Immunogen	Carrier-protein conjugated synthetic peptide encompassing a sequence within the N-terminus region of Zika virus NS1 protein. The exact sequence is proprietary.

(3)

Insol Bla-NS1 recombinant protein (Reducing)

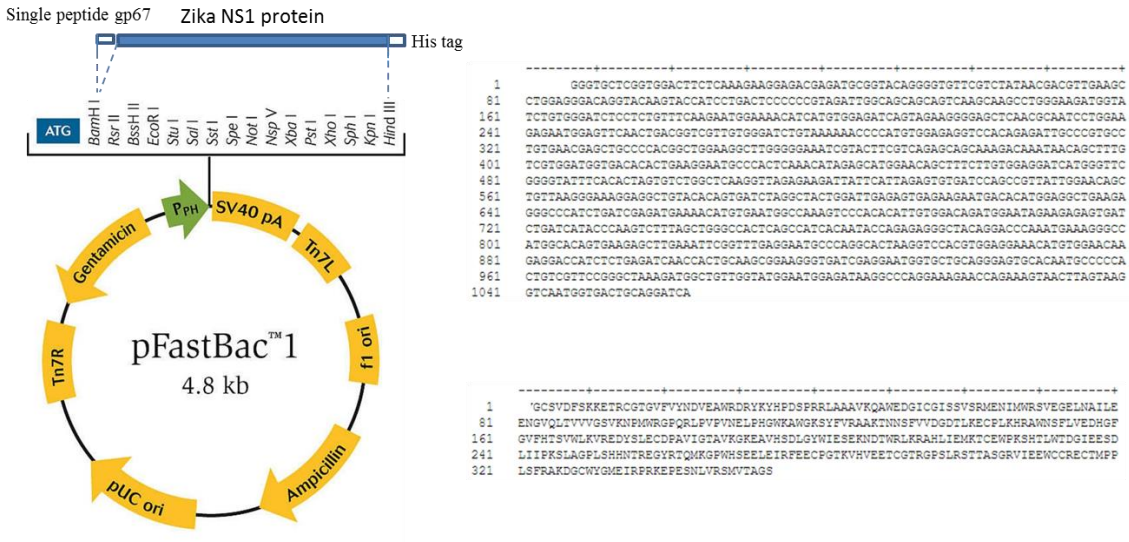
Anti-serum Western Blot



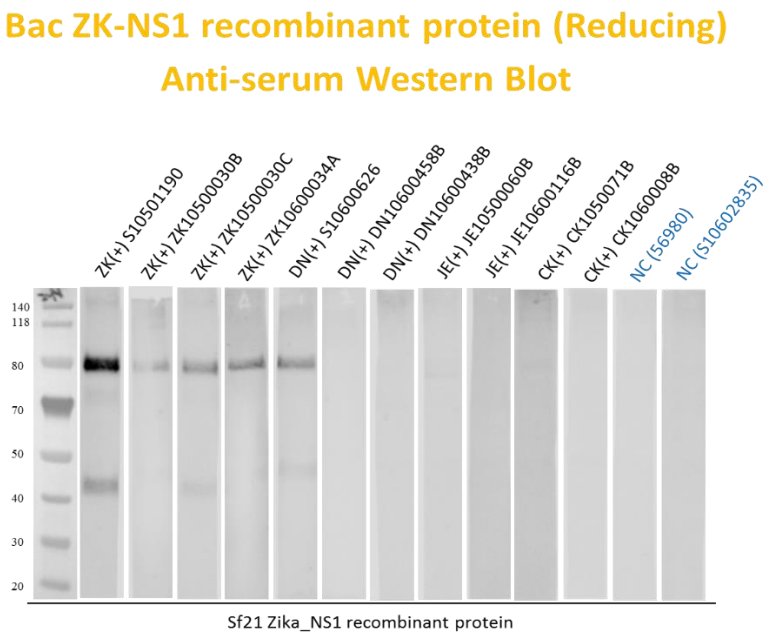
Bla-Zika_NS1 recombinant protein

圖四 利用真核生物系統生產 Zika NS-1 重組蛋白

(1)Expression of recombinant ZiKa NS1 proein by pFastbac(Baculovirus) system

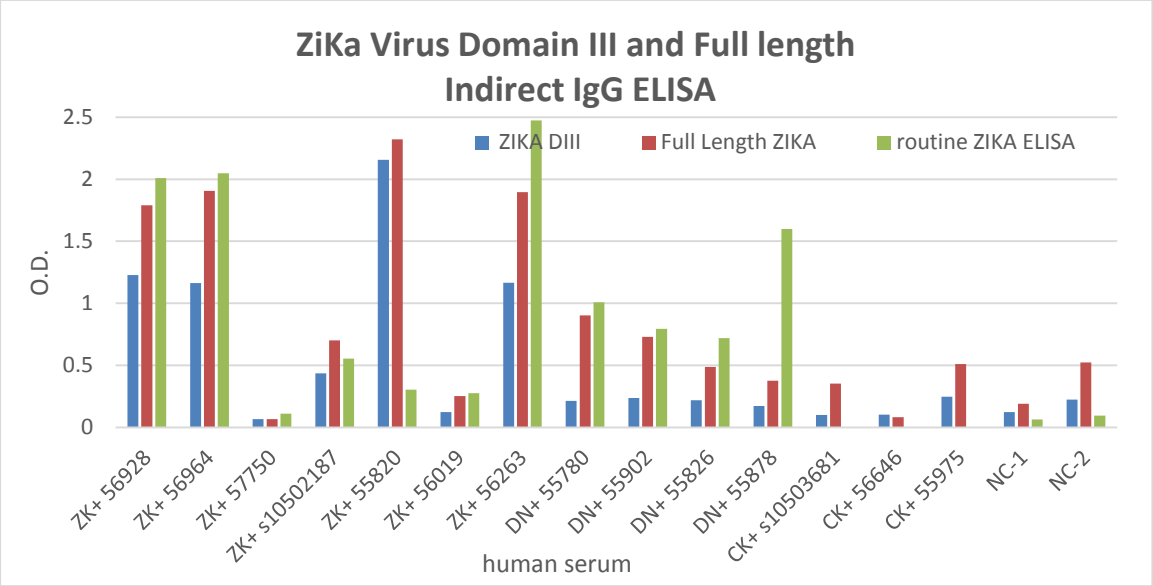


(2)

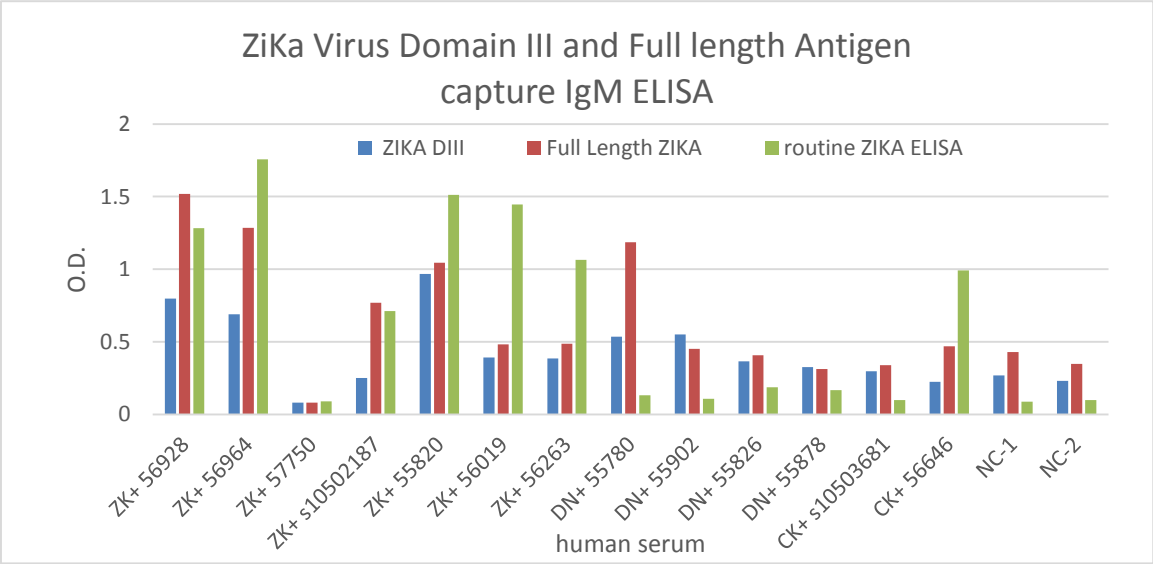


圖五 利用茲卡 E/E DIII 重組蛋白進行酵素免疫法分析

(1)

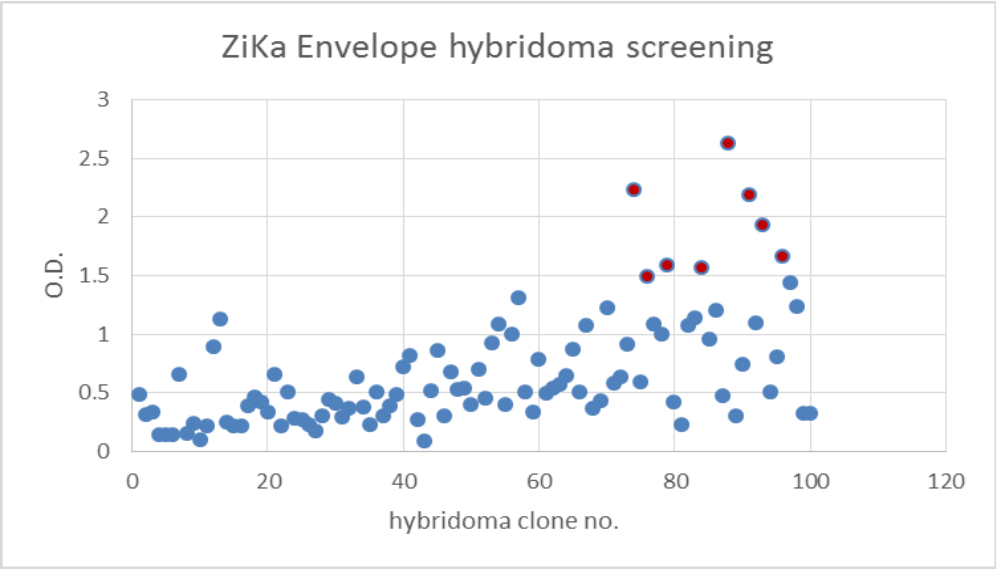


(2)

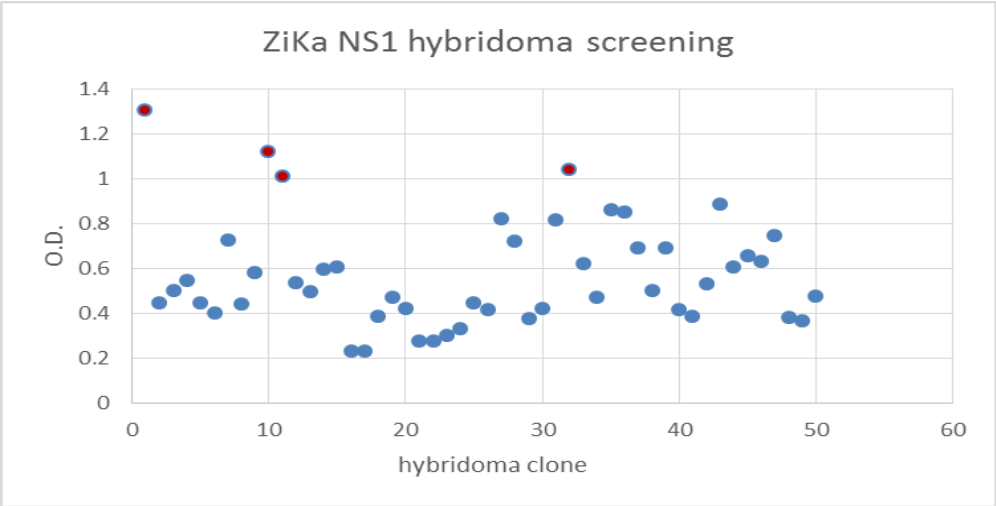


圖六 置備茲卡 E /E DII/ NS1 融合瘤細胞株與篩選單株抗體

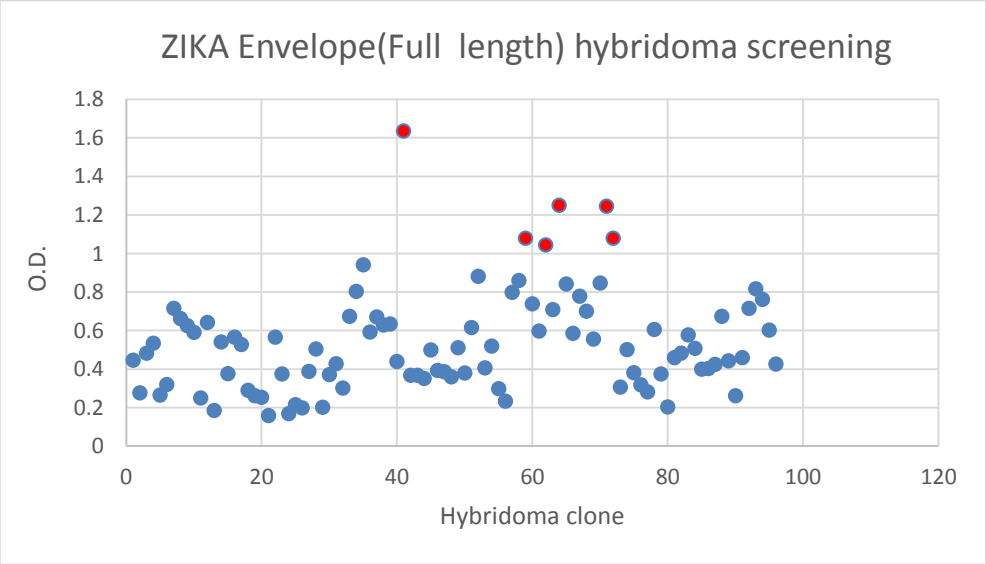
(1)



(2)

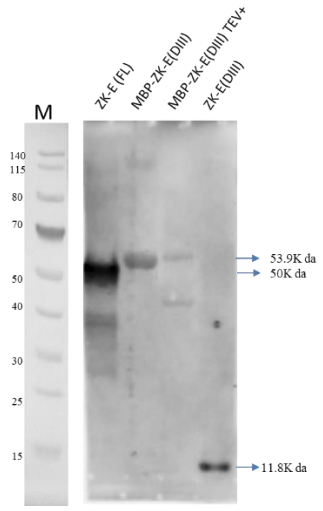


(3)

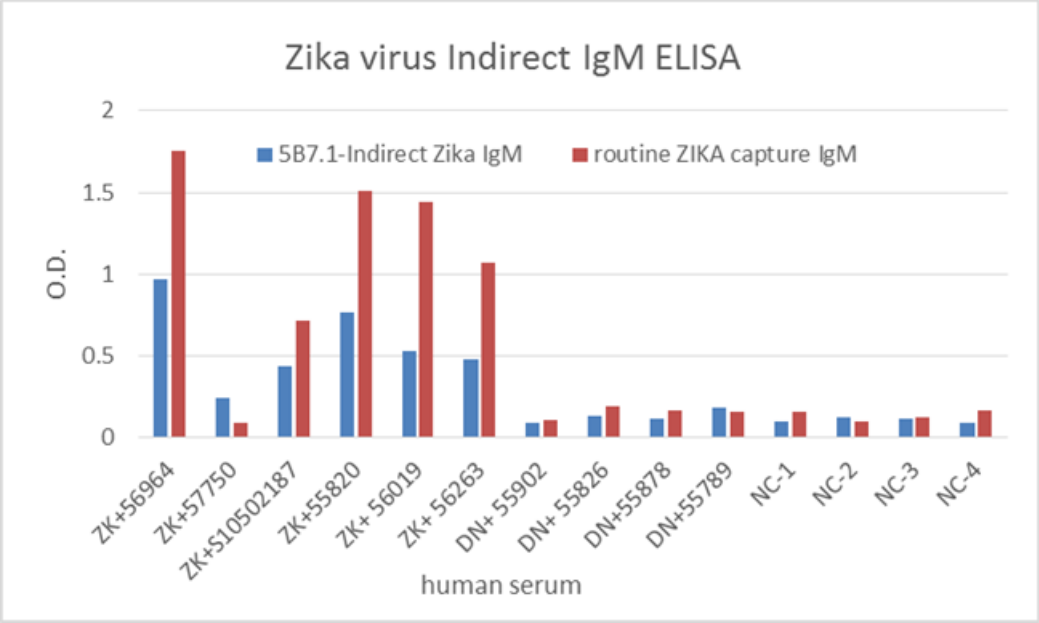


(4)

sf21 Zika E/ E DIII recombinant protein
Western blot (E DIII Hybridoma culture sup. ， 5B7.1)



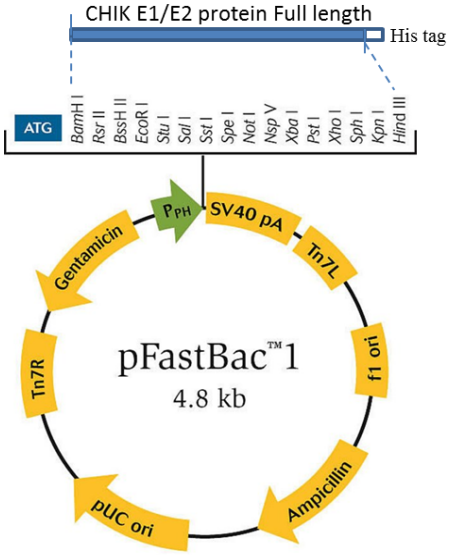
(5)



圖七 利用真核生物系統生產 CHIK E1/E2 重組蛋白

Expression of recombinant CHIK envelope protein by pFastBac (Baculovirus) system

(1)



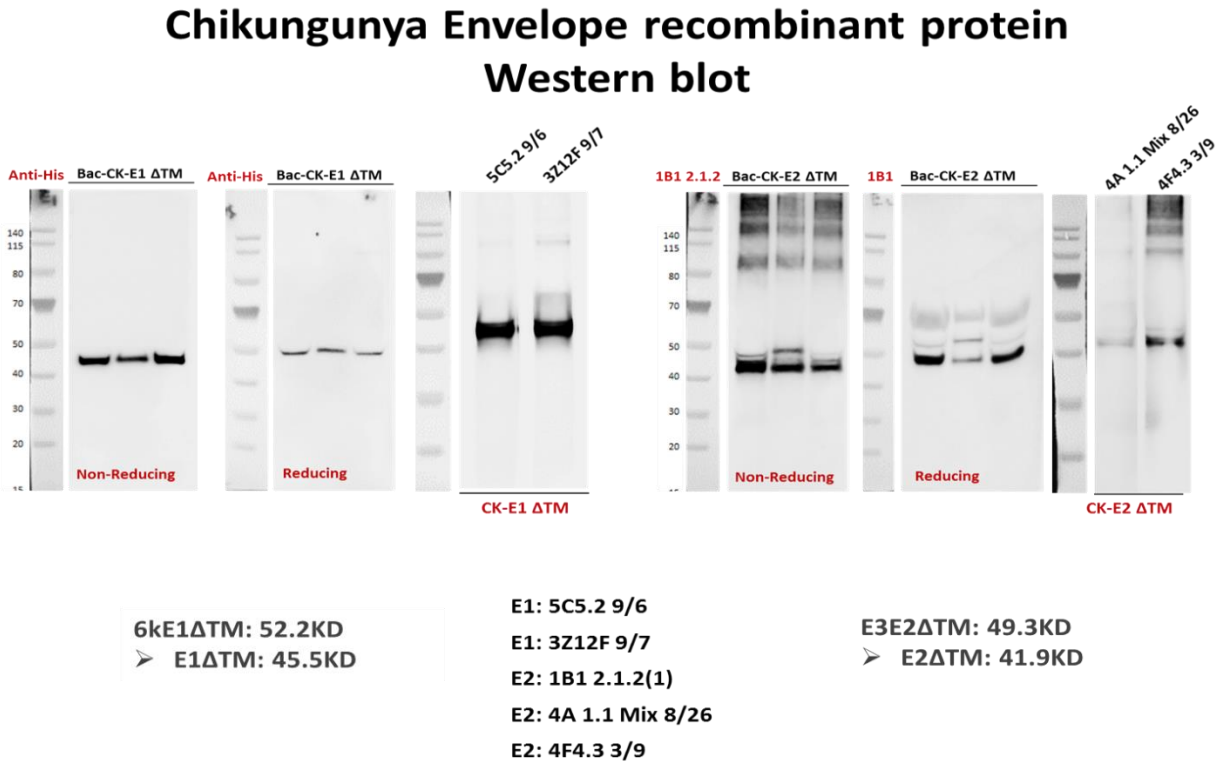
CKV_6kE1ΔTM Sequence

```
   1  ATGGCCACATACCAAGAGGCTGCGATATACCTGTGGAACGAGCAGCAACCTTTGTTTTGGCTACAAGCCCTTATTCCGCT
  81  GGCAGCCCTGATTGTTCTATGCAACTGTCTGAGACTCTTACCATGCTGCTGTAAAACGTTGGCTTTTTTAGCCGTAATGA
 161  GCGTCGGTGCCCACACTGTGAGCGCGTACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACTCTA
 241  GTCAATAGACCTGGCTACAGCCCCATGGTATTGGAGATGGAACTACTGTCAGTCACTTTGGAGCCAACACTATCGCTTGA
 321  TTACATCACGTGCGAGTACAAAACCGTCATCCCGTCTCCGTACGTGAAGTGCTGCGGTACAGCAGAGTGCAAGGACAAAA
 401  ACCTACCTGACTACAGCTGTAAGGTCTTCACCGGCGTCTACCCATTTATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTCTGCGACGCT
 481  GAAAACACGCAGTTGAGCGAAGCACATGTGGAGAAGTCCGAATCATGCAAAACAGAATTTGCATCAGCGTACAGGGCTCA
 561  TACCGCATCTGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCCTTTACCAAGGAAATAACATCACTGTAACTGCCTATGCAAACGGCGACC
 641  ATGCCGTCACAGTTAAGGACGCCAAATTCATTGTGGGGCCAATGTCTTCAGCCTGGACACCTTTCGACAACAAAATTGTG
 721  GTGTACAAAGGTGACGTCTATAACATGGACTACCCGCCCTTTGGCGCAGGAAGACCAGGACAATTTGGCGATATCCAAAG
 801  TCGCACACCTGAGAGTAAAGACGTCTATGCTAATACACAACTGGTACTGCAGAGACCGGCTGTGGGTACGGTACACGTGC
 881  CATACTCTCAGGCACCATCTGGCTTTAAGTATTGGCTAAAAGAACGCGGGGCGTCACTGCAGCACACAGCACCATTTGGC
 961  TGCCAAATAGCAACAAACCCGGTAAGAGCGGTGAACTGCGCCGTAGGGAACATGCCCATCTCCATCGACATACCGGAAGC
1041  GGCCTTCACTAGGGTCGTCGACGCGCCCTCTTTAACGGACATGTCGTGCGAGGTACCAGCCTGCACCCATTCCTCAGACT
1121  TTGGGGGCGTCGCCATTATTAAATATGCAGCCAGCAAGAAAGGCAAGTGTGCGGTGCATTCGATGACTAACGCCGTCACT
1201  ATTCGGGAAGCTGAGATAGAAGTTGAAGGGAATTCTCAGCTGCAAATCTCTTTCTCGACGGCCTTAGCCAGCGCCGAATT
1281  CCGCGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACACTGTGCAGCTGAGTGCCACCCCCCGAAGGACCACATAGTCAACTACCCGG
1361  CGTCACATACCACCCTCGGGGTCCAGGACATCTCCGCTACGGCGATGTCATGGATGCATCATCATCATCATCATTAG

   1  MATYQEAAIYLWNEQQPLFWLQALIPLAALIVLCNCLRLLPCCCKTLAFLAVMSVGAYEHVTVIPNTVGVPYKTL
  81  VNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYVKCCGTAECKDKNLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDA
 161  ENTQLSEAHVEKSESCKTEFASAYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVTAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIV
 241  VYKGDVYNMDYPFFGAGRPGQFGDIQSRTPESKDVYANTQLVLQRPAVGTVHVPYSQAPSGFKYWLKERGASLQHTAPFG
 321  CQIATNPVRAVNCAVGNMPISIDIPEAAFTRVVDAPSLTDMSCEVPACTHSSDFGGVAIIKYAASKKGKCAVHSMTNAVT
 401  IREAEIEVEGNSQLQISFSTALASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWMHHHHHH
```

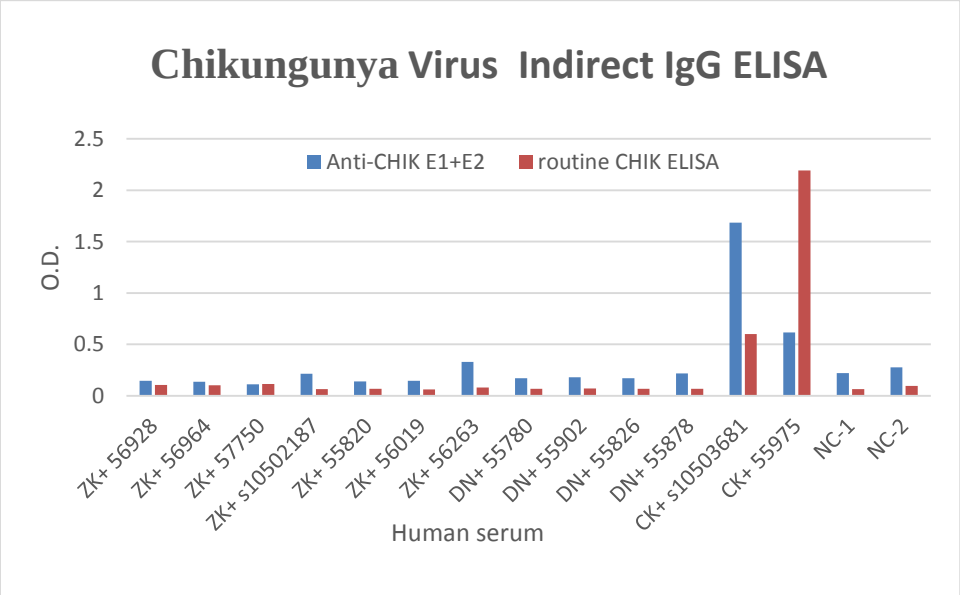
CKV_E3E2ΔTM Sequence

```
   1  ATGAGTCTTGCCATCCCAGTTATGTGCCTGTTGGCAAACACCACGTTCCCCTGCTCCCAGCCCCCTTGCACGCCCTGCTG
  81  CTACGAAAAGGAACCGGAGGAAACCCTACGCATGCTTGAGGACAACGTCATGAGACCTGGGTACTATCAGCTGCTACAAG
 161  CATCCTTAACATGTTCTCCCCACGGCCAGCGACGCAGCACCAAGGACAACTTCAATGTCTATAAAGCCACAAGACCATAC
 241  TTAGCTCACTGTCCCGACTGTGGAGAAGGGCACTCTGTGCCATAGTCCCGTAGCACTAGAACGCATCAGAAATGAAGCGAC
 321  AGACGGGACGCTGAAAATCCAGGTCTCCTTGCAAATCGGAATAAAGACGGATGACAGCCACGATTGGACCAAGCTGCGTT
 401  ATATGGACAACCACATGCCAGCAGACGCAGAGAGGGCGGGGCTATTTGTAAGAACATCAGCACCGTGTACGATTACTGGA
 481  ACAATGGGACACTTCATCCTGGCCCGATGTCCAAAAGGGGAAACTCTGACGGTGGGATTCACTGACAGTAGGAAGATTAG
 561  TCATTCATGTACGCACCCATTTCACCACGACCCTCCTGTGATAGGTCGGGAAAAATTCCATTCCCGACCGCAGCACGGTA
 641  AAGAGCTACCTTGCAGCACGTACGTGCAGAGCACCGCCGCAACTACCGAGGAGATAGAGGTACACATGCCCCCAGACACC
 721  CCTGATCGCACATTAATGTCACAACAGTCCGGCAACGTAAAGATCACAGTCAATGGCCAGACGGTGCGGTATAAGTGTAA
 801  TTGCGGTGGCTCAAATGAAGGACTAACAACTACAGACAAAGTGATTAATAACTGCAAGGTTGATCAATGTCATGCCGCGG
 881  TCACCAATCACAAAAAGTGGCAGTATAACTCCCCTCTGGTCCCGCGTAATGCTGAACTTGGGGACCGACAAGGAAAAATT
 961  CACATCCCGTTTCCGCTGGCAAATGTAACATGCAGGGTGCCTAAAGCAAGGAACCCCACCGTGACGTACGGGAAAAACCA
1041  AGTCATCATGCTACTGTATCCTGACCACCCAACGCTCCTGTCCTACCGGAATATGGGAGAAGACCAACTATCAAGAAG
1121  AGTGGGTGATGCATAAGAAGGAAGTCGTGCTAATCGTGCCGACTGAAGGGCTCGAGGTCACGTGGGGCAACAACGAGCCG
1201  TATAAGTATTGGCCGCAGTTATCTACAAACGGTACAGCCCATGGCCACCCGCATGAGATAATTCTGTATTATTATGAGCT
1281  GCTGCAGCATCATCATCATCATCATTAG

   1  MSLAIPVMCLLANTTFPCSQPPCTPCCYEKEPEETLRMLEDNVMRPGYYQLLQASLTCSPHRQRRSTKDNFNVYKATRPY
  81  LAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIKTDDSHDWTKLRYMDNHMPADAERAGLFVRTSAPCTITG
 161  TMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRKISHSCTHPFHHDPFVIGREKFHSRPQHGKELPCSTYVQSTAATTEEIEVHMPPDT
 241  PDRTLMSQQSGNVKITVNGQTVRYKCNCGGSNEGLTTTDEVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSPLVPRNAELGDRQGKI
 321  HIPFPLANVTCRVPKARNPTVTYGKNQVIMLLYPDHPTLLSYRNMGEEPNYQEEWVMHKKEVVLIVPTEGLEVTWGNNEP
 401  YKYWPQLSTNGTAHGHPHEIILYYYELLQHHHHHH
```

(2)



(3)

mAb Ascites	Ag coating ELISA					IFA	
	CHIKV (Asian)	CHIKV (African)	rE1s	rE2	rD2 NS1	CHIKV (Asian)	CHIKV (African)
CK 5C5.2 (IgG1, K)	2.709	2.564	2.896	0.063	0.075	+++	+++
CK 1E3.2 (IgG1, K)	2.707	2.476	3.162	0.075	0.091	+++	+++
CK 1B1.1 (IgG2a, K)	2.505	2.210	0.114	0.082	0.131	+++	+++
CK 4A1.1 (IgG2a, K)	2.510	2.219	ND	ND	ND	+++	+++
PC (10-8G) (IgG2b, K)	1.903	2.047	0.090	1.772	0.070	+++	+++
PC (15-7C) (IgG2a, K)	1.134	1.174	0.058	1.115	0.108	+++	+++
PC (3581) (Anti-Alphavirus)	1.746	0.702	0.145	0.173	ND	++	++

(4)